



Eur pâisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication :

0 200 590
B1

⑫

FASCICULE DE BREVET EUROPÉEN

⑯ Date de publication du fascicule du brevet :
19.07.89

⑮ Int. Cl.⁴ : **C 12 N 15/00, C 12 N 9/84,**
C 12 P 21/02, A 61 K 37/02 //
(C12P21/02, C12R1:19)

㉑ Numéro de dépôt : **86400618.4**

㉒ Date de dépôt : **24.03.86**

㉔ Procédé de préparation microbiologique de la sérum-albumine humaine.

㉓ Priorité : **25.03.85 FR 8504385**

㉕ Date de publication de la demande :
05.11.86 Bulletin 86/45

㉖ Mention de la délivrance du brevet :
19.07.89 Bulletin 89/29

㉗ Etats contractants désignés :
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

㉘ Documents cités :
EP-A- 0 083 069
EP-A- 0 091 527
EP-A- 0 107 823
WO-A-84/045 41

㉙ Titulaire : **GENETICA**
160 Quai de Polangis
94340 Joinville Le Pont (FR)

㉚ Inventeur : **Knapp, Michael**
17 Place des Vosges
F-75004 Paris (FR)
Inventeur : **Brefort, Georges**
3 rue Las Cases
F-75007 Paris (FR)
Inventeur : **Latta, Martine**
297 rue de Charenton
F-75012 Paris (FR)
Inventeur : **Mayaux, Jean-François**
21 ter Boulevard de la République
F-92260 Fontenay aux Roses (FR)
Inventeur : **Sarmientos, Paolo**
F-75012 Paris
F-75012 Parisnay aux Roses (FR)

㉛ Mandataire : **Pilard, Jacques et al**
RHONE-POULENC RECHERCHES Service Brevets
Pharma 25, Quai Paul Doumer
F-92408 Courbevoie Cedex (FR)

EP 0 200 590 B1

Il est rappelé que : Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

La présente invention concerne un nouveau procédé de synthèse protéique.

Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé mettant en œuvre les techniques de manipulations génétiques *in vitro*, pour obtenir un réarrangement concerté de séquences d'acide déoxyribonucléique permettant d'induire la synthèse de la sérum-albumine humaine par une bactérie.

5 La sérum-albumine humaine est une protéine constituée de 585 acides aminés, ne contenant pas de résidus glycosidiques associés et ayant un poids moléculaire de l'ordre de 66 000 daltons.

Génétiquement, la sérum-albumine humaine est codée chez l'homme par deux gènes alléliques autosomiques et codominants. Les gènes de la sérum-albumine humaine sont notamment polymorphiques, et l'on connaît au moins vingt-quatre variants de sérum-albumine différenciés par leur comportement électrophorétique (Shell et Blumberg, « The genetics of Human serum-albumin », dans « Albumin Structure, Function and Uses », Rosencr, Oratz et Rothschild éds., Pergamon Press, 1977).

10 La sérum-albumine est synthétisée dans les hépatocytes, puis excrétée dans le sérum dont elle constitue la protéine la plus abondante, avec des concentrations moyennes de l'ordre de 4 g/100 ml de sérum. Elle joue un rôle physiologique majeur dans le maintien de la pression oncotique du plasma, et contribue ainsi à la stabilité de l'équilibre entre milieu intérieur (cellulaire) et milieu extérieur (circulant), 15 équilibre qui assure, entre autres fonctions, le maintien d'un taux d'hydratation cellulaire compatible avec le fonctionnement physiologique normal de l'organisme.

La sérum-albumine joue également un rôle dans le transport de molécules hydrophobes « naturelles » (stéroïdes et sels biliaires par exemple) ou médicamenteuses jusqu'à leurs sites d'action.

20 Ceci explique que la sérum-albumine humaine soit utilisée soit dans la thérapeutique des troubles de la volémie, par exemple hypovolémies aigües post-hémorragiques, brûlures étendues, soit en thérapeutique d'appoint dans les solutés dits de remplissage en chirurgie générale, soit dans le traitement des états de déshydratation (par exemple des syndromes néphrotiques), toutes ces utilisations exigeant l'apport de quantités considérables de sérum-albumine (plusieurs dizaines de grammes par jour par malade).

25 La sérum-albumine humaine est extraite actuellement du sérum par des techniques dérivées de celle de E. J. Cohn et coll., J. Am. Chem. Soc. (1946), 68, p. 459 et suivantes, ou de placentas par la technique de J. Lautaud et coll., 13th Internat. Congress of IABS, Budapest ; A : Purification of Proteins. Development of Biological Standard (1973) Karger, éd., Bale, 27, p. 107 et suivantes. Ces sources, qui suffisent à peine aux besoins du marché mondial, souffrent de plusieurs défauts, entre autres leur caractère aléatoire. Par ailleurs, elles ne sont pas dépourvues de risques de contaminations (hépatite par exemple, et plus récemment syndrome immuno-déficitaire acquis), ce qui aurait des conséquences dramatiques lors d'une utilisation thérapeutique.

30 Les techniques de recombinaison génétique *in vitro* offrent maintenant la possibilité de faire synthétiser par un microorganisme, par exemple la bactérie *Escherichia coli*, n'importe quelle protéine ou 35 n'importe quel polypeptide, et ce théoriquement en quantités illimitées (voir par exemple F. Gros et coll., Sciences de la Vie et Société, Documentation Française éd. 1979).

On sait, depuis les expériences classiques de F. Jacob et coll., que l'ADN contient d'une part un ensemble de gènes dits « de structure », c'est-à-dire codant pour une protéine donnée, et d'autre part des gènes dits « de régulation », c'est-à-dire capables de moduler l'expression des gènes de structure, 40 l'association des deux types formant une entité dite « opéron ».

Les recherches en biologie moléculaire et la mise au point des techniques de séquençage de l'ADN (F. Sanger et A. R. Coulson, J. Mol. Biol. (1975), 94, p. 441 et suivantes ; A. M. Maxam et W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1977), 74, p. 560 et suivantes) ont permis de préciser l'organisation de l'opéron telle que l'avaient conçue F. Jacob et J. Monod (F. Jacob et J. Monod, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1961), 26, p. 193 et suivantes ; F. Jacob et J. Monod, J. Mol. Biol. (1961), 3, p. 318 et suivantes), et 45 d'identifier les caractères particuliers de la structure primaire des deux types de gènes.

Ainsi, tout gène de structure est encadré d'un codon dit « d'initiation de traduction » (ATG) et d'un codon « d'arrêt ». Le codon d'initiation a pour fonction de fixer un ARN de transfert porteur d'une formylméthionine. La chaîne protéique s'allongera à partir de cette formylméthionine par attachements successifs des acides aminés codés par le gène de structure ; le codon « d'arrêt » provoquera enfin un arrêt de l'allongement et la libération de la protéine néoformée.

En ce qui concerne les gènes régulateurs (promoteurs, répresseurs), définissant par exemple un promoteur comme un fragment d'ADN sur lequel se fixe l'ARN polymérase, on a pu identifier les séquences les plus conservées (D. Pribnow, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1975), 72, p. 784 et suivantes) ; 55 de même on a pu définir les séquences d'ADN les plus conservées au niveau des sites de fixation des ribosomes (RBS) (J. Shine et . Dalgarno, Nature (1975), 254, p. 34 et suivantes), sites qui jouent un rôle dans la traduction en protéine de l'ARN transcript.

Ainsi les gènes régulateurs bactériens peuvent donc être définis par leurs propriétés fonctionnelles et aussi par leur séquence primaire, ce dont les techniques de recombinaisons génétiques *in vitro* tirent profit pour placer un gène de structure quelconque sous leur contrôle, ceci grâce à l'existence des « enzymes de restriction », qui coupent l'ADN en des points spécifiques (H. O. Smith et K. W. Wilcox, J. Mol. Biol. (1970), 51, p. 379 et suivantes ; M. Meselson et R. Yuan, Nature (1968), 217, p. 1110 et suivantes ; R. J. Roberts, Nucleic Acids Res. (1982), 1, p. 135 et suivantes).

Les techniques utilisées, et connues par ailleurs, mettent en œuvre l'utilisation concertée d'enzymes pour couper l'ADN en des points pré-déterminés, et d'enzymes dites « ligases » pour lier les fragments entre eux (P. E. Loban et A. D. Kaiser, J. Mol. Biol. (1973), 78, p. 453 et suivantes). L'ensemble est porté par des « vecteurs » (plasmides ou bactériophages), susceptibles d'être introduits dans une bactérie telle que *E. coli* selon des procédés connus par ailleurs, et de s'y maintenir lors de la croissance de la bactérie-hôte (M. Mandel et A. Higa, J. Mol. Biol. (1970), 53, p. 154 et suivantes).

5 Ainsi la présente invention concerne un procédé permettant d'induire la biosynthèse de la sérum-albumine humaine dans un microorganisme.

L'invention consiste à modifier *in vitro* le gène de structure de la sérum-albumine humaine de telle sorte qu'il possède un codon d'initiation, puis à lier le gène de structure modifié à un gène régulateur inducible.

10 Une bactérie-hôte, telle que *E. coli*, contenant le gène modifié, produit un taux d'albumine détectable après induction dans des conditions définies.

Dans ce qui suit la signification des termes techniques employés en Biologie Moléculaire sera supposée connue (cf. par exemple « Biologie Moléculaire du Gène », de J. Watson, édition française, Interditions 1978). Dans ce qui suit seront décrits successivement la construction et les procédés d'expression du gène de la sérum-albumine humaine.

A. Construction du gène de la sérum-albumine humaine

20 1. Préparation d'ARN messager de foie

On utilise des cellules hépatiques, obtenues par exemple par biopsie, et on en extrait l'ARN messager selon la méthode décrite par exemple par V. Glisin et coll., Biochemistry (1974), 13, p. 2633 et suivantes ; et par R. Deeley et coll., J. Biol. Chem. (1977), 252, p. 8310 et suivantes. On traite la biopsie par une solution de thiocyanate de guanidine 6 M, et l'on purifie l'ARN total par plusieurs cycles de précipitation dans l'éthanol à -20 °C, centrifugation et redissolution des culots de centrifugation.

25 On enrichit la préparation en ARN messager par plusieurs cycles de chromatographie d'affinité sur des colonnes d'oligo (dT)-cellulose, selon la technique décrite par H. Aviv et P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1972), 69, p. 1408 et suivantes. L'ARN messager ainsi isolé, contenant 1 à 2 % de l'ARN total, est conservé en solution aqueuse à -70 °C.

30 On peut déterminer la proportion d'ARN messager spécifique de la sérum-albumine humaine au sein de la population totale (par exemple par traduction *in vitro* d'un aliquot de la solution d'ARN dans des lysats de réticulocytes de lapin). Une méthode consiste à utiliser le lysat de réticulocytes fournis par la société Amersham, suivant le protocole préconisé par ce fournisseur. On peut ainsi déterminer la fraction de protéine néoformée immunoprécipitable par des anticorps anti-albumine au sein de l'ensemble des protéines néoformées. On obtient par exemple une fraction de l'ordre de 6 %.

40 2. Synthèse de cDNA et clonage dans *E. coli*

a. Synthèse du premier brin

45 A partir de la technique de G. N. Buell et coll., J. Biol. Chem. (1978), 253, p. 2471 et suivantes, modifiée, on utilise par exemple 5 µg d'ARN messager total dans un volume final de 50 micro-litres d'une solution contenant : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM MgCl₂, 0,4 mM DTT, 20 mM KCl, 0,4 mM Na pyrophosphate, 1 mM de chaque nucléotide triphosphate (dNTP), 100 µg/ml de oligo (dT)₁₂₋₁₈, 0,5 U/ml d'inhibiteur de ribonucléases, 50 picomoles de traceur radioactif et 40 unités de Transcriptase réverse (Société Life Science, Inc.).

50 La réaction de transcription réverse de l'ARN messager en ADN complémentaire (cDNA) se poursuit pendant 1 heure à 42 °C.

Le taux de synthèse de cDNA est calculé par mesure du taux d'incorporation du traceur radioactif en molécules acido-précipitables, selon une technique connue.

Après 1 heure, on arrête la réaction par addition d'EDTA (20 mM), et l'on détruit l'ARN messager par digestion alcaline dans 50 mM de NaOH, à 42 °C, pendant 3 heures.

55 On sépare le cDNA néoformé des dNTPs non-incorporés et des produits de dégradation alcaline des ARNs par chromatographie, par exemple, sur une colonne de Sephadex G100 (Pharmacia Fine Chemicals). On obtient 1,5 µg de cDNA simple brin à partir de 5 µg d'ARN messager total.

b. Synthèse du deuxième brin

60 Le cDNA simple brin est converti en ADN double brin par action du fragment « Klenow » de l'ADN polymérase I.

Les conditions de réaction sont : 100 mM Hepes pH 7, 10 mM MgCl₂, 2,25 mM DTT, 70 mM KCl, 0,5 mM de chaque dNTP, et 50 unités du fragment « Klenow » de l'ADN polymérase I (commercialisée par exemple par la Société New England Biolabs Inc.).

La réaction est poursuivie pendant 15 heures, à 15 °C, et l'on sépare l'ADN double brin des dNTPs non incorporés à nouveau par chromatographie sur colonne de Sephadex G100.

5 c. Clonage de l'ADN double brin

Pour supprimer les molécules d'ADN simple brin et obtenir un ADN double brin à extrémités franches, on traite les séquences non appariées par la nuclease S₁ selon la technique décrite par A. Efstradiatis et coll., Cell (1976), 7, p. 279 et suivantes. On sépare les ADNs néoformés double brin selon leur taille par centrifugation dans un gradient de saccharose. On utilise généralement un gradient de 5 % - 20 % de saccharose en 50 mM Tris-HCl pH 8,5 10 mM EDTA, 800 mM NaCl, centrifugé à 210 000 g pendant 15 heures, à 20 °C, et on effectue un fractionnement du gradient en aliquots après centrifugation.

On contrôle la taille des molécules dans chaque fraction par électrophorèse déchantillons faite en parallèle avec des étalons d'ADN de tailles connues, et l'on regroupe les fractions contenant un ADN constitué par l'enchaînement de plus de 500 paires de bases.

Pour permettre le clonage de cet ADN on allonge d'abord ses extrémités 3' avec de l'oligo(dC), et on allonge parallèlement les extrémités 3' du site PstI du plasmide vecteur pBR322 avec de l'oligo(dG) selon la technique de F. Rougeon et coll., J. Biol. Chem. (1977), 252, p. 2209 et suivantes.

20 On hybride alors l'ADN double brin décrit ci-dessus au plasmide vecteur, selon par exemple la technique de L. Villa-Komaroff et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978), 75, p. 3727 et suivantes.

On crée une « banque » de clones de cDNAs de foie par transformation de la bactérie E. coli avec l'ADN ainsi décrit selon la méthode décrite par M. Mandel et A. Higa, J. Mol. Biol. (1970), 53, p. 154 et suivantes et M. Dagert et S. D. Erlich., Gene (1979), 6, p. 23 et suivantes.

25

d. Repérage des clones de cDNA albumine

30 On utilise une technique d'hybridation sur colonies à l'aide d'oligonucléotides synthétiques dont les séquences sont déduites de la séquence protéique de l'albumine humaine (B. Meloun et coll., FEBS Letters (1975), 58, p. 134 et suivantes ; M. Grunstein et D. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1975), 72, p. 3961 et suivantes ; R. B. Wallace et coll., Nucleic Acids Res. (1981), 9, p. 879 et suivantes).

Les clones sont cultivés par séries de 96 sur milieu de Luria contenant 25 µg/ml de tétracycline, en boîtes carrées, directement sur des filtres de nitrocellulose. Après croissance à 37 °C puis amplification en présence de 250 µg/ml de chloramphénicol, les colonies sont lysées par la soude puis hybridées avec les oligonucléotides radioactivés en 5' par kinatation, dans une solution contenant : 5 X SSC, 0,5 % NP 40, 100 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé par ébullition et refroidi rapidement dans la glace, 0,5 mg/ml d'oligonucléotide kinasé. L'hybridation est effectuée à 37 °C pendant 18 heures. On lave ensuite les filtres en 5 X SSC, à 25 °C, puis 37 °C, puis 45 °C et ce pendant quatre fois 15 minutes à chaque étape.

40 Les filtres sont alors exposés sur films Kodak X-OMAT, à -70 °C, avec un écran amplificateur pendant 15 à 24 heures. Les clones hybrides avec les sondes sont réisolés puis lysés. L'ADN plasmidique est purifié par centrifugation en milieu chlorure de césum-bromure d'éthidium selon une technique connue.

45 On séquence l'ADN de l'insertion par la technique de Maxam-Gilbert (A. Maxam et W. Gilbert, Methods Enzymol. (1980), 65, p. 499 et suivantes) pour comparer la séquence protéique dérivée de la séquence nucléotidique et celle de la sérum-albumine humaine.

On identifie ainsi une série de clones dont les insertions correspondent à l'ensemble du gène de la sérum-albumine humaine.

50 Dans la figure 1 est représentée la carte de restriction du gène de la sérum-albumine, ainsi que la position de trois des insertions les plus représentatives, désignées par « pTIBII », « pAA38 », « p6D8 ».

e. Incorporation au gène de structure d'un codon d'initiation (figure 2)

55

a) On digère l'ADN du plasmide « pTIBII » par les enzymes PstI et Pvull, et on isole un fragment d'ADN de 125 paires de bases, correspondant à la séquence de l'extrémité 5' du gène de la sérum-albumine (acides aminés n° 1 à 62). On fixe à l'extrémité Pvull une séquence de jonction constituée du site de reconnaissance de l'enzyme BamHI. On obtient ainsi un fragment PstI-BamHI.

60 On prépare d'autre part un oligonucléotide synthétique ayant 21 bases de long, possédant un triplet « ATG » devant les nucléotides codant pour les acides aminés de la sérum-albumine humaine ainsi qu'un site de restriction Ncol, et dont la séquence est la suivante : 5'GAATCCATGGATGCACACAAG 3'.

On d'nature le fragment d'ADN PstI-BamHI, et on l'hybride avec l'oligonucléotide synthétique. L'hybridation se fait par la séquence 5'...GATGCACACAAG 3', l'extrémité 3' du brin d'ADN complémentaire étant désappariée. On digère les extrémités désappariées, puis on polymérisé dans le sens 5'...3' avec le

fragment « Klenow » de l'ADN polymérase I, d'après les techniques de H. Jacobsen et coll., Eur. J. Biochem. (1974), 45, p. 623 et suivantes.

On obtient ainsi un fragment contenant en 5' une extrémité franche, un site Ncol puis le triplet ATG et en 3' un site BamHI.

5

b) On réalise la ligation de trois fragments d'ADN :

1) un fragment EcoRI-BamHI du plasmide « pLG200 » (L. Guarante et coll., Cell (1980) 20, p. 543 et suivantes) portant un gène de résistance aux antibiotiques, l'origine de réPLICATION et l'extrémité 3' du gène de la β -galactosidase,

10

2) un fragment EcoRI-PvuII du plasmide « pGL101 » (G. Lauer et coll., J. Mol. Appl. Genet. (1981), 1, p. 139 et suivantes) portant le promoteur P_{lac} et le site de fixation de ribosome (RBS) du gène lacZ d'E. coli,

3) le fragment d'ADN mutagénisé codant pour les 62 premiers acides aminés de l'albumine humaine.

15

On isole un plasmide (pXL52) qui réalise une fusion de l'extrémité 5' du gène de la sérum-albumine humaine avec le gène de la β -galactosidase d'E. coli.

f. Construction du gène complet (figure 2)

On digère l'ADN du plasmide « p6D8 » par EcoRI, et partiellement par BgIII, selon une technique déjà décrite. On isole le grand fragment EcoRI-BgIII contenant la séquence codant pour les 405 derniers acides aminés de la sérum-albumine humaine puis l'origine de replication du plasmide et le gène de résistance à la tétracycline.

On digère l'ADN du plasmide « pXL52 » décrit ci-dessus par EcoRI et Sau3A, et on isole un fragment contenant 200 paires de bases.

25 On digère l'ADN du plasmide « pAA38 » par Sau3A et on isole un fragment contenant 540 paires de bases.

On ligature les trois fragments (dans l'ordre [pXL52 EcoRI-Sau3A] — [pAA38 Sau3A] — [p6D8 BgIII-EcoRI]) en tirant profit de la compatibilité entre les sites Sau3A et BgIII. On obtient un plasmide appelé « pXL53 », dont la qualité de la construction est contrôlée par un séquençage complet du fragment compris entre le site EcoRI et le site PstI correspondant à la jonction de l'insertion et du plasmide vecteur.

30 La séquence nucléotidique complète, ainsi que la séquence protéique dérivée, sont représentées dans les figures 3 et 4.

Les variations observées entre cette séquence et la séquence protéique publiée (B. Meloun et coll., FEBS Letters (1975), 58, p. 134 et suivantes ; M. Dayhoff, Atlas of Protein sequence and structure (1978), 5, supplément 3, p. 306) sont les suivantes :

	<u>Position</u>	<u>Meloun et coll.</u>	<u>Sérum albumine humaine déduite de la séquence de "pXL53"</u>
40	131	Glutamine	Acide glutamique
	364	Histidine	Alanine
45	367	Tyrosine	Histidine
	370	Alanine	Tyrosine
	381	Valine	Méthionine
50	464	Acide glutamique	Histidine
	465	Histidine	Acide glutamique
	501	Glutamine	Acide glutamique

55

B. Construction de systèmes d'expression de la sérum-albumine humaine

1^o Utilisation du promoteur « P_L » du bactériophage lambda

a) On linéarise le plasmide « pXL53 » par digestion partielle par l'enzyme Ncol, en ne considérant que le site Ncol en 5' du codon d'initiation et on forme des bords francs par remplissage selon la technique de R. M. Wartell et W. S. Reznikoff, Gene (1980), 9, p. 307 et suivantes).

On synthétise un « adaptateur » contenant en 5' une séquence correspondant au site de reconnaissance d'une enzyme de restriction telle que BamHI, puis une séquence correspondant à un site de fixation de ribosomes (RBS « Consensus » ou « théorique »). La séquence de l'adaptateur est : 65 5'GGATCCTAGGAGGAAC 3'.

La ligation de l'adaptateur en 5' d'un ADN à bords francs a été décrite, par exemple, par C. P. Bahl et coll., Gene (1976), 1, p. 81 et suivantes.

La méthode consiste à effectuer la réaction sur 20 microlitres d'une solution contenant 50 mM Tris, HCl pH = 7,5, 10 mM MgCl₂, 15 mM DTT, 1mM ATP, 50 µg/ml d'adaptateur, 20 µg/ml d'ADN et 1 unité d'ADN-ligase (New England Biolabs Inc.). La réaction est poursuivie pendant 10 heures à 15 °C. Cette ligation crée un site BamHI sans supprimer le site NcoI.

On digère le produit de ligation par BamHI et par HinDIII. Du fait de la présence d'un site HinDIII en 3' du gène de la sérum-albumine humaine, on obtient un fragment d'ADN contenant la totalité de la séquence codante.

10 On sous-clone le fragment HinDIII-BamHI ainsi obtenu par exemple dans le plasmide « pBR322 » en transformant E. coli selon la méthode déjà décrite ci-dessus pour obtenir le plasmide « pXL61 ». Le plasmide « pXL61 » ne contient pas de promoteur.

Le promoteur « P_L » du bactériophage lambda est placé sur le chromosome du bactériophage entre un site BglII et un site BamHI (voir E. Szybalski et W. Szybalski, Gene (1979) 7, p. 217 et suivantes), et dont 15 la séquence nucléotidique est connue (F. Sanger et coll., J. Mol. Biol. (1982), 162, p. 279 et suivantes). On peut cloner ce fragment et modifier ses sites de restriction selon des méthodes connues.

On note que les plasmides portant P_L doivent être propagés dans des souches de E. coli portant le gène répresseur cl, ceci afin d'éviter que ce promoteur ne s'exprime de façon constitutive.

Dans une première construction, P_L est disponible sous forme d'un fragment BamHI à partir du 20 plasmide « pPL-lambda » (Pharmacia P. L. Biochemicals). L'insertion de ce fragment BamHI dans le site BamHI du plasmide « pXL61 » permet d'obtenir le plasmide « pXL65 », dans lequel on a vérifié que l'orientation du promoteur par rapport au gène de structure de la sérum-albumine humaine est correcte.

D'autres constructions peuvent être réalisées à partir de plasmides disponibles. On peut, par exemple, exciser du plasmide « pP_L-lambda » un fragment HaeIII-HaeIII contenant le promoteur P_L et 25 l'insérer dans le site SmaI d'une séquence de clonage multisite portée sur un plasmide, tel que le plasmide « pUC8 » (J. Vieira et J. Messing, Gene (1982), 79, p. 259 et suivantes) pour obtenir « pUC8-P_L » dans lequel le site EcoRI est en 5' du promoteur.

A partir du plasmide « pPSI » (P. Sarmientos et coll., Cell (1983), 32, p. 1337 et suivantes), on peut 30 d'abord détruire le site HinDIII le plus proche du site NdeI (figure 2) puis remplacer le petit fragment EcoRI-HinDIII par, d'une part, le fragment EcoRI-BamHI du plasmide « pUC8-P_L » contenant le promoteur P_L, et, d'autre part, le fragment BamHI-HinDIII du plasmide « pXL61 » contenant le gène de la sérum-albumine. On obtient ainsi le plasmide « pXL70 » dans lequel l'ensemble P_L-RBS « consensus »-ATG-gène de la sérum-albumine humaine est porté sur un fragment d'ADN EcoRI-HinDIII.

b) Remplacement du RBS « consensus » par celui du gène CII du bactériophage lambda.
35 Le gène CII du bactériophage lambda dont la séquence et le site d'initiation sont connus peut être traduit avec efficacité (E. Schwarz et coll., Nature (1978), 272, p. 410 et suivantes).

On construit un plasmide contenant le système d'expression « Promoteur « P_L » - RBS CII - ATG - gène sérum-albumine ».

Par exemple, on peut après avoir détruit le site BamHI de « pUC8-P_L » par action de l'enzyme SI (A. J. Berck et P. A. Sharp, Cell (1977), 12, p. 721) isoler un fragment EcoRI-HinDIII contenant le promoteur P_L et ensuite lier ce fragment avec un fragment EcoRI-HinDIII du plasmide « pDS20 » (G. Duester et coll., Cell 1982), 30, p. 855 et suivantes pour obtenir le plasmide « pXL73 ».

Le RBS du gène CII est extrait du plasmide « pPSI ». On digère ce plasmide par NdeI et on insère un adaptateur BamHI après formation d'extrémités franches. On excise alors le RBS sous forme d'un 45 fragment HinDIII-BamHI.

On construit d'abord un plasmide « pXL88 » dans lequel ce fragment HinDIII-BamHI est lié avec le grand fragment HinDIII-BamHI du plasmide « pXL73 ». Dans le nouveau plasmide « pXL88 » le RBS CII est inséré dans la bonne orientation par rapport au promoteur P_L, le tout dans un système multisites de telle sorte que l'ensemble P_L-RBS CII soit porté sur un fragment d'ADN EcoRI-BamHI de 578 paires de bases.

50 Le fragment EcoRI-BamHI de 578 paires de bases est sous-cloné entre les sites EcoRI et BamHI du plasmide « pMC1403 » (M. J. Casadaban et coll., J. Bacteriol. (1980), 143, p. 971 et suivantes) qui porte le gène de la β-galactosidase (lacZ) après le site BamHI. Cette construction conduit au plasmide « pXL91 » dans lequel le gène de la β-galactosidase est exprimé sous contrôle du système « P_L-RBS CII ».

On sous-clone le fragment BamHI-BglII du plasmide « pXL61 » décrit précédemment dans le site 55 BamHI du plasmide « pMC1403 ». (La ligation d'un site BglII dans un site BamHI est possible, mais l'excision par BamHI en BglII ne l'est plus ; il ne reste donc qu'un site BamHI).

Cette construction (« pXL71 ») aboutit à l'insertion d'un fragment d'ADN de 700 paires de bases comportant la séquence « BamHI-[RBS « consensus »-ATG-NcOI-gène partiel de la sérum-albumine (codant pour les acides aminés 1 à 218)-gène de la β-galactosidase].

60 On coupe ce plasmide par BamHI et SfaI (le site SfaI est présent dans le gène de la β-galactosidase) et on l'insère dans le plasmide « pXL91 » décrit précédemment à la place du fragment préexistant BamHI-SfaI.

On aboutit alors au plasmide « pXL97 » dont l'insertion a la structure suivante :

« Site EcoRI - P_L - RBS CII - site BamHI -RBS « consensus »-site NcOI - ATG - gène partiel de la sérum-albumine - gène de la β-galactosidase ».

On digère le plasmide « pXL97 » par BamHI et partiellement par NcoI en ne considérant que le site NcoI proche du codon d'initiation et on forme les bords francs par action de la nuclease S1, puis on le referme sur lui-même. Cette manipulation, d'une part, supprime la séquence d'ADN du RBS « consensus » et, d'autre part, met en phase un ATG du RBS CII avec la séquence de la sérum-albumine.

5 On obtient ainsi le plasmide « pXL136 » qui comporte la séquence « site EcoRI-P_L-RBS CII-ATG-g » ne partie de la sérum-albumine-gène de la β -galactosidase ».

Le gène partiel de la sérum-albumine possédant un site Pvull, on digère le plasmide « pXL136 » par EcoRI et Pvull et on extrait un fragment de 760 paires de bases qui est inséré entre les sites EcoRI et Pvull

10 10 « P_L-RBS CII-gène sérum-albumine complet » sur un fragment EcoRI-HinDIII, comme le plasmide « pXL70 » et qui porte la substitution RBS « consensus » par celui du gène CII.

c) Expression de la sérum-albumine après induction du promoteur « P_L ».
On inocule une colonie isolée de *E. coli* portant le gène répresseur thermosensible du promoteur « P_L » (gène cl^{ts}) et transformée par l'un des plasmides « pXL65 », « pXL70 » et « pXL139 ».

15 Lorsque la bactérie est en phase exponentielle, on induit le promoteur « P_L » du plasmide en élévant très rapidement la température d'incubation à 42 °C. On continue l'incubation pendant 90 minutes. On préleve un échantillon de la culture et on lyse la bactérie dans une suspension contenant 60 mM Tris-HCl pH = 6,8, 2 % SDS ? 100 mM β -mercaptoéthanol, 10 % de glycérol et 0,1 % de bleu de bromophénol pendant 5 minutes.

20 On sépare les protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de U. K. Laemli, Nature (1970), 227, p. 680 et suivantes ou de K. Weber et M. Osborne, J. Biol. Chem. (1969), 244, p. 4406 et suivantes.

On transfère les protéines sur un filtre de nitrocellulose (M. Bittner et coll., Anal. Biochem. (1980) 102, p. 459 et suivantes ; E. J. Stellwag et A. E. Dahlberg, Nucleic Acid Res. (1980), 8, p. 229 et suivantes). On détecte la présence d'albumine humaine par immunologie, soit avec des anticorps anti-albumine humaine puis fixation de protéine A marquée, soit avec des anticorps anti-albumine biotinyrés et révélés par des complexes avidine-peroxydase.

25 On met ainsi en évidence la présence d'une protéine qui réagit avec des anticorps anti-albumine humaine, qui co-migre avec l'albumine authentique et qui n'est présente dans les lysats d'*E. coli* qu'après induction de cette bactérie à 42 °C en présence du plasmide « pXL65 », « pXL70 » ou « pXL139 ».

30 On peut doser le taux de sérum-albumine humaine produite dans ces conditions. On obtient de façon reproductible une proportion d'albumine produite de l'ordre de 0,1 % de l'ensemble des protéines mises en évidence dans un lysat d'*E. coli* en conditions dénaturantes.

2^o Utilisation du promoteur de l'opéron « tryptophane » (P_{tp}) en tandem avec le promoteur de la Pénicilline amidase de *E. coli*.

35 L'introduction du gène de structure de la sérum-albumine humaine derrière un promoteur bactérien inducible permet l'expression de cette protéine dans *E. coli*. Les taux d'expression des différents systèmes décrits précédemment sont voisins et de l'ordre de 1 000 molécules de sérum-albumine par cellule. Ces résultats sont voisins de ceux obtenus avec des systèmes analogues tels qu'ils sont décrits dans les demandes de brevet européen EP 73646 et EP 91527. En particulier dans la demande de brevet européen EP 91527, il est indiqué une production maximale de 8 000 molécules par cellule d'un « polypeptide semblable à la sérum-albumine humaine ». La protéine obtenue n'est pas rigoureusement identique à la sérum-albumine humaine et les taux produits sont incompatibles avec les exigences de productivité industrielle. Par ailleurs, la production de sérum-albumine s'accompagne d'un effet létal sur la bactérie productrice.

40 Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que la production de la sérum-albumine humaine peut être considérablement améliorée en utilisant un plasmide contenant après le gène du prépeptide de la pénicilline amidase de *E. coli*, le gène de structure de la sérum-albumine humaine dont l'expression est contrôlée par deux gènes régulateurs en tandem.

45 Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de préparation de la sérum-albumine humaine par culture d'une bactérie telle qu'*E. coli* contenant un plasmide possédant après le gène du prépeptide (peptide signal) de la pénicilline amidase de *E. coli*, le gène de structure de la sérum-albumine humaine dont l'expression est contrôlée par le promoteur de la pénicilline amidase en tandem avec un promoteur inducible tel que le promoteur de l'opéron « tryptophane » « P_{tp} ».

50 Le promoteur de l'opéron « tryptophane » d'*E. coli* permet d'induire l'expression d'un gène lorsque la souche d'*E. coli* est cultivée en absence de tryptophane ou en présence d'un analogue tel que l'acide indolyl-3 acrylique (C. Yanofsky et coll., Nucleic Acids Res. (1981), 9, p. 6647 et suivantes). Un tel promoteur est disponible sur des plasmides tels que « pDR720 » (Société Pharmacia PL Biochemicals) (voir aussi D. Russel et G. Bennett, Gene (1982), 20, p. 231 et suivantes).

55 60 La pénicilline G amidase (PAM) (EC 3.5.11 ; pénicilline aminohydrolase) de *E. coli*, qui transforme la pénicilline G en acide amino-6 pénicillanique, est produite par des souches de *E. coli* telles que *E. coli* ATCC 11105 (C. Kutzbach et E. Rauenbusch, Hoppe-S yler's Z. Physiol. Chem. (1974), 354, p. 45 et suivantes ; E. J. Vandamme, Econ mic Microbiology (1980), 5, p. 467 et suivantes). Cette enzyme possède un peptide signal qui est excisé normalement par *E. coli*. Le gène a été cloné et sa structure primaire a été définie par séquençage (H. Mayer et coll., dans « Plasmids of Medical, Environmental and Commercial

Importance » (1979), K. N. Timmis et A. Pühler, éditeurs, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 459 et suivantes et W. Bruns et coll., dans « Third European Congress of Biotechnology », (1984) vol. III, Verlag Chemie, p. 371 et suivantes). La séquence du peptide signal est constituée d'un codon « ATG » d'initiation de traduction suivi de 75 nucléotides codant pour les 25 acides aminés du peptide signal. Le gène de la sérum-albumine humaine y est fusionné de telle sorte que la phase de traduction soit conservée. Ainsi, après traduction, le premier acide aminé de l'albumine (acide aspartique) se trouve à la jonction du site d'excision du peptide signal.

Cette construction peut être réalisée de la manière suivante :

Un fragment EcoRI-PstI du chromosome de *E. coli* ATCC 11105 contenant le gène de la PAM est inséré entre les sites EcoRI et PstI du plasmide pBR 322. On obtient ainsi le plasmide « pXL20 ».

Le fragment HinDIII-HinDIII du plasmide « pXL20 » contenant le gène de la PAM est ensuite inséré dans la même orientation que le promoteur P_L dans le site HinDIII du plasmide « pXL73 ». On obtient ainsi le plasmide « pXL125 » contenant la séquence « promoteur P_L -gène de la PAM ». Le plasmide « pXL125 » est digéré par NruI (site à extrémités franches) et un site de restriction synthétique BamHI est inséré dans le site situé au début du gène de la PAM à 170 nucléotides du site HinDIII. Le fragment BamHI-BamHI [NruI] contenant P_L donne le plasmide « pXL134 » en se ligaturant sur lui-même.

On remplace ensuite le fragment EcoRI-BamHI du plasmide « pXL70 » par le fragment EcoRI-BamHI du plasmide « pXL134 » contenant le promoteur P_L , le RBS et le début du gène de la PAM. On obtient ainsi le plasmide « pXL137 » contenant la séquence « EcoRI- P_L -[promoteur-RBS-nucléotides codant pour le peptide signal]PAM-BamHI-RBS « consensus »-ATG-gène de la sérum-albumine.

On remplace le fragment EcoRI-Sall du plasmide « pXL137 » par celui du plasmide « pDR720 ». On obtient le plasmide « pXL194 » qui contient la construction suivante : « EcoRI- P_{TBP} -Sall-[Promoteur-RBS-nucléotide du peptide signal]PAM-BamHI-RBS « consensus » ATG-gène sérum-albumine ».

On réalise la fusion peptide signal-sérum-albumine par mutagénèse in vitro après sous-clonage dans le bactériophage M13mp10 (J. Messing, Methods Enzymol. (1984), 101, p. 20 et suivantes) selon les techniques connues (J. P. Adelman et coll., DNA (1983), 2, p. 183). La qualité de la fusion est vérifiée par le plasmide « pXL288 » qui présente la structure suivante : « EcoRI- P_{TBP} -Sall [Promoteur-RBS-ATG-nucléotides du peptide signal]PAM-gène sérum-albumine ».

On transforme des souches de *E. coli* telles que *E. coli* E 103S ou *E. coli* B par le plasmide « pXL288 ». On ensemence une dilution au 1/100 d'une culture de 16 heures en milieu riche de *E. coli* (pXL288) dans un milieu minimum M9 enrichi (0,1 % casamino acids) sans tryptophane et on incube, à 37 °C, sous agitation constante. La croissance est arrêtée en fin de phase exponentielle et les bactéries sont lysées aux ultra-sons puis centrifugées. Les protéines du surnageant et du culot sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. On obtient un taux de sérum-albumine humaine de l'ordre de 10 % des protéines observées en conditions dénaturantes.

Dans ces conditions, la production de sérum-albumine humaine est voisine de 10 mg par litre de milieu pour une absorbance de 1 à 610 nm. Dans ces conditions, on ne constate pas d'effet létal sur la souche bactérienne.

De plus, on peut trouver des conditions telles que la fusion PAM-sérum-albumine humaine, non mûrée in vivo, soit digérée par une peptidase spécifique des séquences « leaders » de *E. coli* (P. B. Wolf et coll., J. Biol. Chem. (1982), 257, p. 7098 et suivantes) pour redonner une protéine identique à la sérum-albumine humaine authentique.

Un échantillon du microorganisme *E. coli* B, G 1151 contenant le plasmide pXL288 a été déposé au CBS à Baarn (Pays-Bas) sous le numéro CBS 152.86 conformément aux dispositions du Traité de Budapest.

50 Revendications

- Procédé de préparation microbiologique de la sérum-albumine humaine caractérisé en ce que l'on cultive une bactérie capable d'assurer le maintien d'un plasmide contenant après le peptide signal de la pénicilline amidase de *E. coli* le gène de structure de la sérum-albumine humaine dont l'expression est contrôlée par le promoteur de la pénicilline amidase en tandem avec un promoteur inductible placé en amont.
- Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le promoteur inductible est celui de l'opéron tryptophane P_{TBP} .
- Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que la bactérie capable d'assurer le maintien du plasmide est choisie parmi les souches d'*E. coli*.
- Le plasmide « pXL288 » caractérisé en ce qu'il contient le promoteur P_{TBP} en amont du promoteur de la pénicilline amidase d'*E. coli*, le site de fixation de ribosomes du gène de la pénicilline amidase, le codon d'initiation ATG et les nucléotides du peptide signal de la pénicilline amidase fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine (numéro de dépôt de la sonche d'*E. coli* contenant pXL288 CBS 152.86).

Claims

1. Process for the microbiological preparation of human serum albumin, characterized in that a bacterium is cultured which is capable of providing for the maintenance of a plasmid containing, after the signal peptide of *E. coli* penicillin amidase, the structural gene for human serum albumin, the expression of which is controlled by the penicillin amidase promoter in tandem with an inducible promoter situated upstream.
- 5 2. Process according to Claim 1, characterized in that the inducible promoter is that of the tryptophan operon, P_{trp} .
- 10 3. Process according to one of Claims 1 and 2, characterized in that the bacterium capable of providing for the maintenance of the plasmid is chosen from strains of *E. coli*.
- 15 4. Plasmid « pXL288 », characterized in that it contains the P_{trp} promoter upstream of the *E. coli* penicillin amidase promoter, the ribosome binding site of the penicillin amidase gene, the ATG initiation codon and the nucleotides for the penicillin amidase signal peptide, fused with the structural gene for human serum albumin (deposition number of the *E. coli* strain containing pXL288 : CBS 152.86).

Patentansprüche

- 20 1. Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung von menschlichem Serumalbumin, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Bakterium kultiviert, das imstande ist, den Bestand eines Plasmids zu sichern, das nach dem Signalpeptid von Penicillinamidase von *E. coli* das Strukturen menschlichen Serumalbumins enthält, dessen Expression durch den Penicillinamidase-Promotor im Tandem mit einem upstream angeordneten induzierbaren Promotor geregelt wird.
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der induzierbare Promotor jener des Operons Tryptophan P_{trp} ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium, das den Bestand des Plasmids zu sichern vermag, ausgewählt ist den Stämmen von *E. coli*.
- 30 4. Plasmid « pXL288 », dadurch gekennzeichnet, daß es den Promotor P_{trp} upstream vom Penicillinamidase-Promotor von *E. coli*, die Ribosomenbindestelle des Penicillinamidase-Gens, das Startcodon ATG und die Nucleotide des Signalpeptids der Penicillinamidase, fusioniert mit dem Strukturen des menschlichen Serum-Albumins, enthält (Hinterlegungs-Nummer des pXL288 enthaltenden Stammes von *E. coli* : CBS 152.86).

35

40

45

50

55

60

65

Carte de restriction du gène de l'albumine humaine et position des insertions

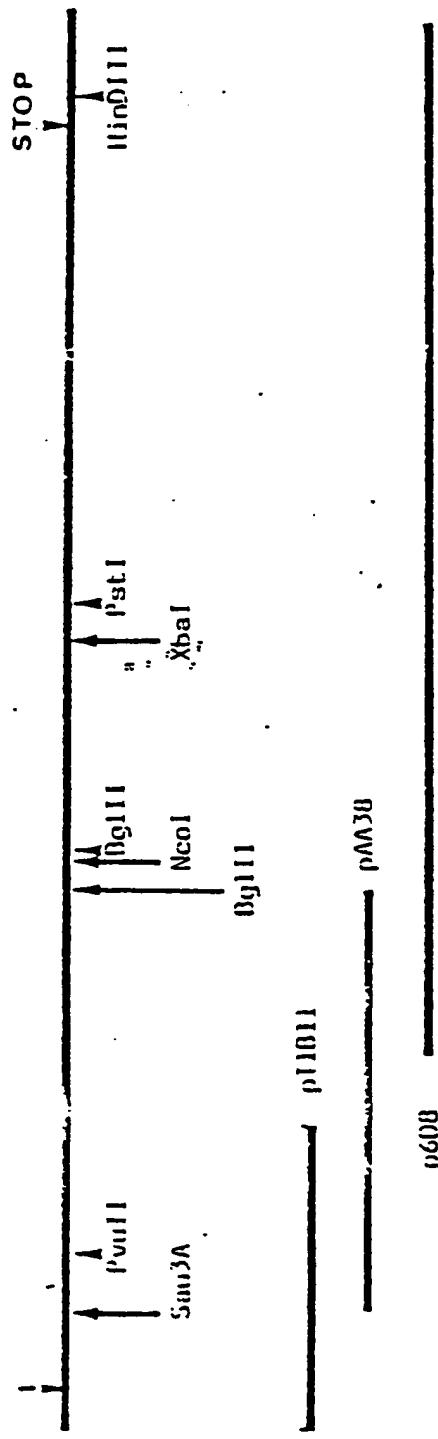


Figure 1

Le chiffre 1 correspond au 1er acide aminé de l'albumine humaine.

L'insertion du plasmide "pT1B11" s'étend au-delà de l'extrémité 5', vers la séquence de la proalbumine.

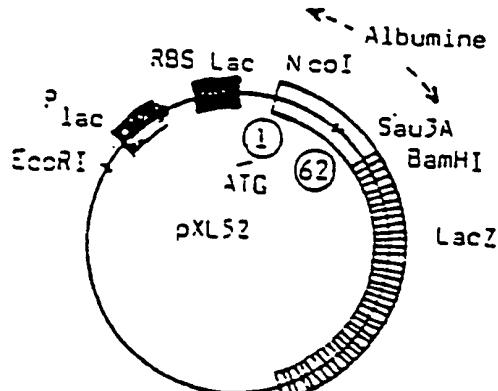
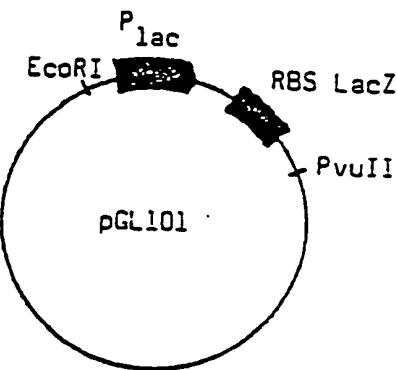
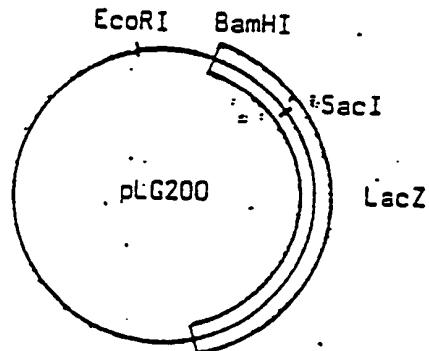
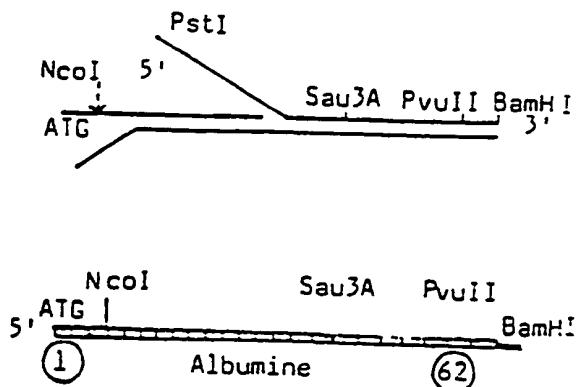
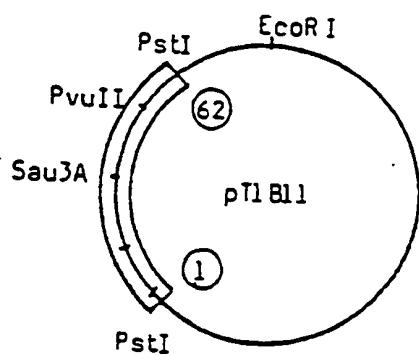
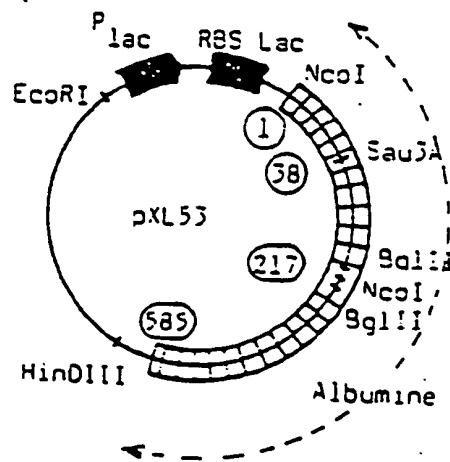


Figure 2



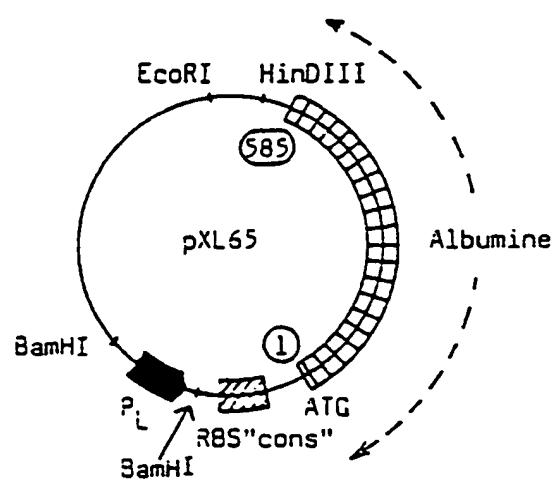
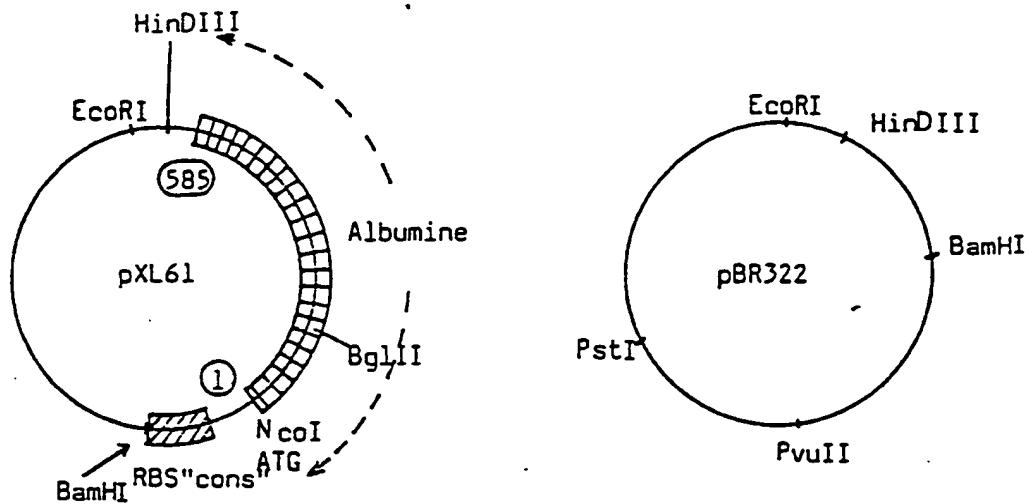


Figure 2

EP 0 200 590 B1

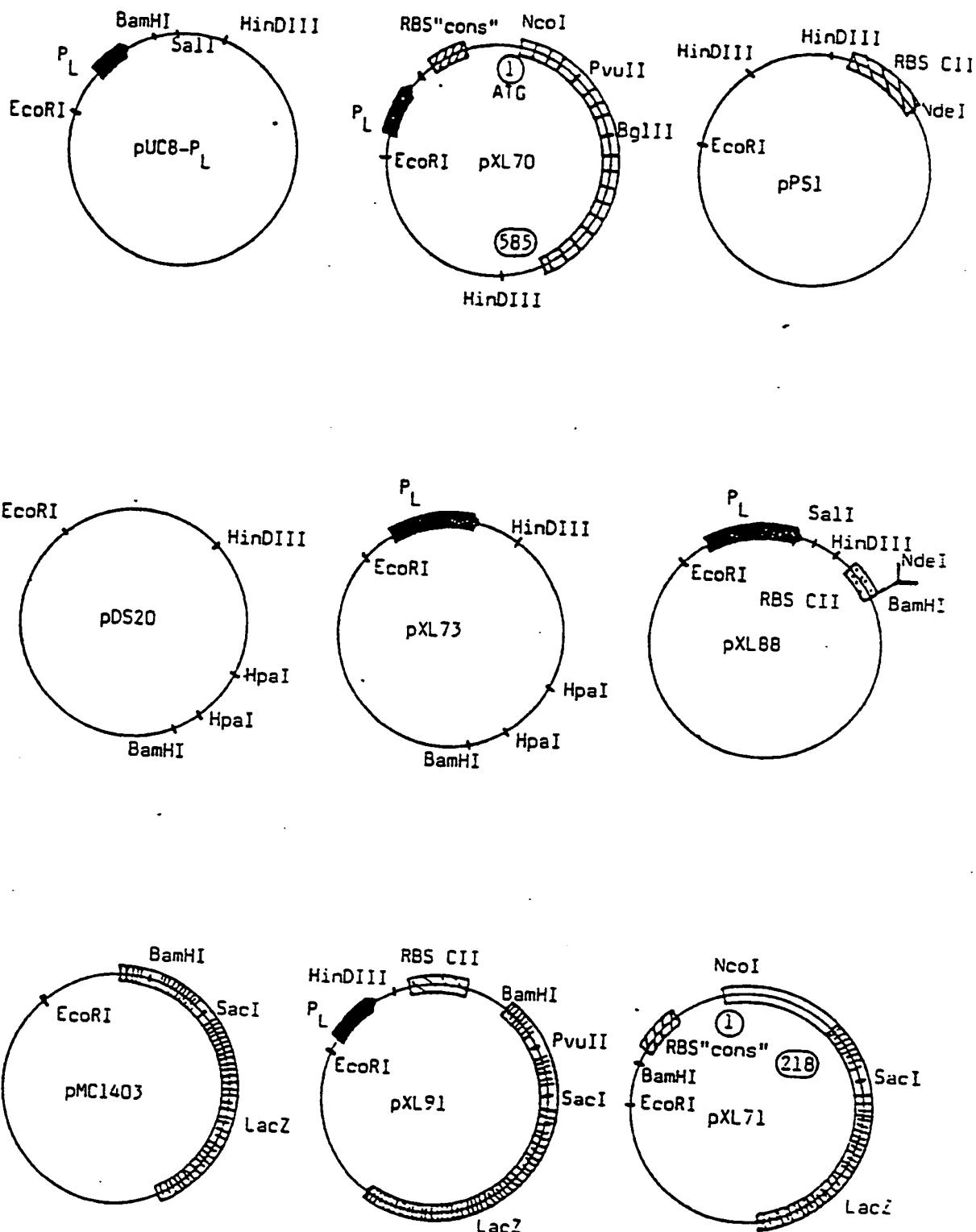


Figure 2

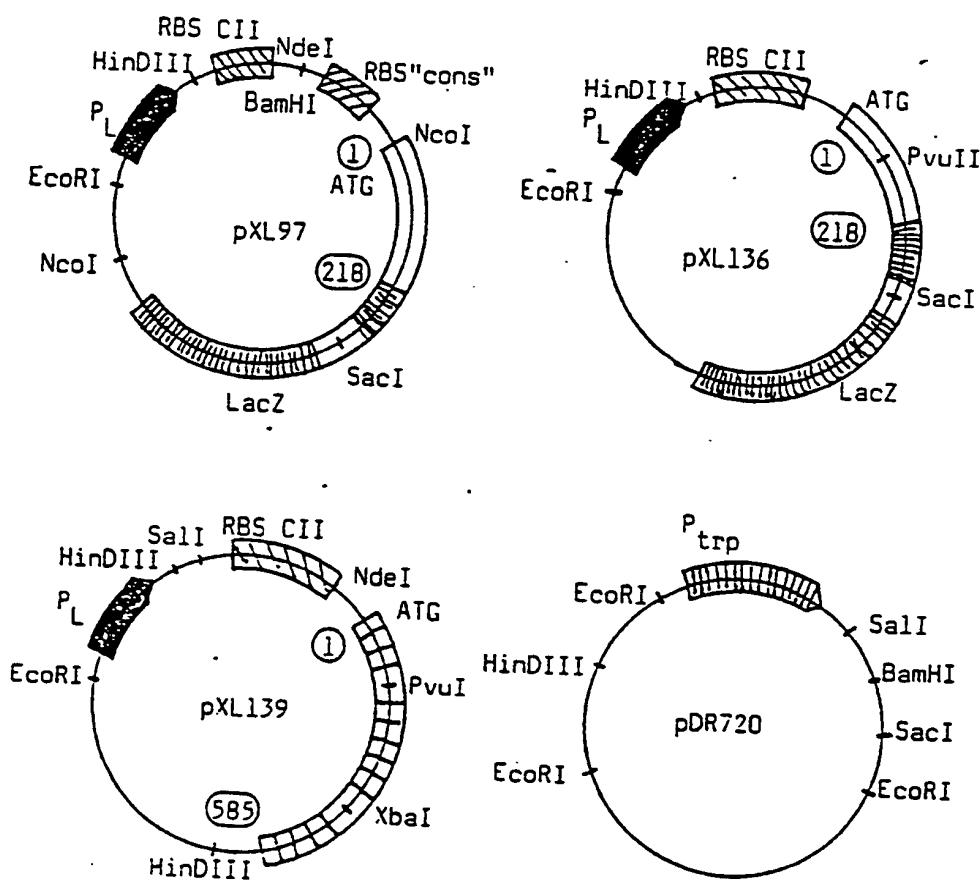


Figure 2

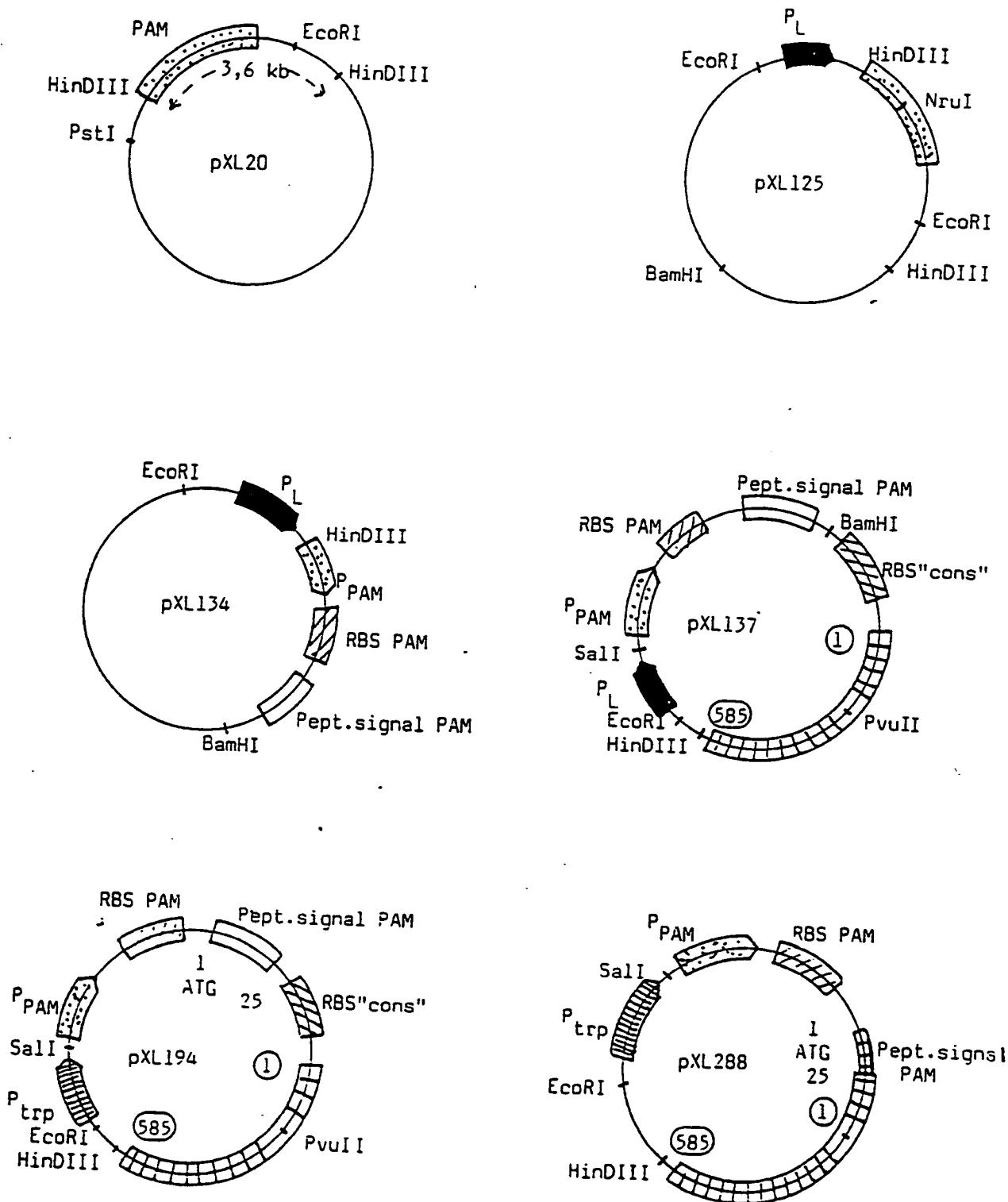


Figure 2

FIGURE 3

EP 0 200 590 B1

330 340 350 360 370 380 390 400
TTTGGAGAAATTGACAGTTGCAACTTCCTGGAAACCTATGGTGAATGGCTGACTCTGTCCAAAGAACCG
AAACCTCTCTGTAACTGTCAACCTTGAGAAGCAGTTGGATAACACTTACCGACTGACCACTGACCTTTGTTCTTG

410 420 430 440 450 460 470 480
TGAGAGAAATGAAATGCCCTTGGAAACACAAAGATGACAATCCAAATCTCCCCGATTTGAGACCAGGTTGATGTA
ACTCTCTTAACTTACGGAAACGGTGTGTTCTACTGTTAGGGTTAGGGGCTAACCACTCTGGCTCCAACTACACT

490 500 510 520 530 540 550 560
TGTGCACTGCTTCAAGACAATGAAAGAGACATTGTTGAAAATACTTATACTGAAATTGCCAGAACATCCTTACTTT
ACACGTGACGAAAAAGTACTGTTACTCTCTTAAACTTTTATACTTAACTTTAACTGCTCTGAGGTTCTGAGGAAATGAAA

570 580 590 600 610 620 630 640
TATGCCCGGAACTCCTTTCTTGCCTAAAGGTTAAAGCTGCTTACAGAAATGTTGCCAAAGCTGGTGTGAAAGCAGS
ATACGGGGCCTTGGAAAGAAACGATTTCATTTGACCAAAATGTTACAAACGGTTGACGACTTATTCGCG

FIGURE 3

EP 0 200 590 B1

650 660 670 680 690 700 710 720
CTGCGTGTGCCAAAGCTCGATGAACCTCGGAAAGGCAACTTCGGTCAAGCTTCCGTTCTGCCTGCAGTC
GACGGAAACGGTTCAAGCTACTTGAAAGCCCTACTTCCTCGGAAAGCAGGCTTCTCTGAGCTCACGCTCA
6 AGCTTTAACCTCTTCTCGAAACTTCCACCCGTCAATCGAGGGAACTCTCTGAGCTTCAAGCTAACCTAACGACT
730 740 750 760 770 780 790 800
TCCAAAATTGGAGAAAGCTTCAAGGCTGGCAGTAGCTCGCTGAGGAGATTTCCGAAAGCTGAGTTTCCGAA
GAAGCTTCAAGCTTCAAGCTTCAAGGAACTTCAAGGCTGGCAGTAGCTCGCTGAGGAGATTTCCGAAAGCTGAG
810 820 830 840 850 860 870 880
CTTCAGCTTCAAGCTTCAAGTCTGAGCTTCAAGGCTTCAAGGCTTCAAGCTAACCTAACGACT
890 900 910 920 930 940 950 960
CAAGGGGACCTTCCAACTATACTGAAATCAAGATTGAGCTTCCAGTAAACTGAGGAAATGCTGAAAACCTC
GTCCCCGCTGAACTCATATAGACACTTTACTTCAAGCTTCAAGGCTTCACTTCACTTCACTTTGGAG

FIGURE 3

FIGURE 3

EP 0 200 590 B1

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
CAAATTTGAGCTTTGAGGAGCTGGAGACTACAAATTCCAGAATTCGGCTTATAGTTGGTACCAAGAAAGTACC
GTTTAACACTCGAAAAACTCGAACCTCATGTTAAGCTTACCGGATAATCAAGGAAATGTGTTCTTCAATGC

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
CCAAGTGTAACTCDAACTCTTGAGGCTCAAGAAACCTGAAGTAGGAAAGTGGGACCCAAATCTTGTAAAACATCCTGAAG
= GTTCACAGTTGAGGTCCAGAETCTCCAGAACATCTCCAGAATGAGATAGGCAACGAACTCTTACACAAACCTTAACATTGAGGACTTC

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
CAAAAGAAATGCCCTGTGAGAACAGTATCTATCCGTGGTCTGAACCAAGTTATGTTGATGAGAAAAGGCCAGTA
GTTTTCTTACGGACACGCTCTGTGATAGATAGGCAACGAACTCTGCTCAATACACAAACCTTAACATTGAGGCTCAT

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
AGTGACAGAGTCACCAAAATGGTGCACAGAAATTCCTTGTGAAACAGGGCAACCTGCTTCAGCTTCGGATGAAAC
TCACGTCTCACTGGTTACGAAACGTTGGCTTACGGAAACGTTGGCTAACGAAAGCTGAGACCTTCAGCTACTTGC

FIGURE 3

EP 0 200 590 B1

FIGURE 3

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
ATGAAGATCAAACGCTTATTCAATTCTGTTTCGTGTTAAAGCCAAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATT
TACTCTAATTTCCAATTAAGTAAGACAACAAAGAAACCAACCACATTTCGGCTTGTTGGACAGATTTCATTAA

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
TCTTTAAATCATTAAATTCAATTTCGCTCTTCTGCTCTGCTTCATTAAATAAAATGAAAGAAATCTAAAAAACCCC
AGAAATTAAATTACTAAACCGAAAGAGACAGAAAGTAAATTATTACTTTACCTTTCTTAGATTTTTCGGGG

2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
Pst I CCCCCCCCCCTGCAGCAATAGCAACCAACGTTCCGAAACTATTAACTGGCAA
GGGGGGGGGACGTCTTATCGTGTGAAACGGTTGATAATTGACCCCTT

FIGURE 4
TRADUCTION DU GENE DE L'ALBUMINE HUMAINE DANS PXL53

EP 0 200 590 B1

①	ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG CTT CCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GCA GAA GAA AAT TTC MET ASP ALA HIS LYS SER GLU VAL ALA HIS ARG PHE LYS ASP LEU GLY GLU GLU ASN PHE	125	140	155	170
185	AAG GCC TTG GTG ATT CCC TTT GCT GAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT LYS ALA LEU VAL LEU ILE ALA PHE ALA GLN TYR LEU GLN GLN CYS PRO PHE GLU ASP HIS	185	200	215	230
245	GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTC ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT VAL LYS LEU VAL ASN GLU VAL THR GLU PHE ALA LYS THR CYS VAL ALA ASP GLU SER ALA	245	260	275	290
305	GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TCC ACA GTT GCA ACT GLU ASN CYS ASP LYS SER LEU HIS THR LEU PHE GLY ASP LYS LEU CYS THR VAL GLU THR	305	320	335	350

FIGURE 4

365	CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA CAA CCT GAG AGA AAT LEU ARG GLU THR TYR GLY GLU MET ALA ASP CYS CYS ALA LYS GLN GLU PRO GLU ARG ASN	380		395		410
425		440		455		470
	GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAT CCA AAT CTC CCC CCA TTG CTG AGA CCA GAG GLU CYS PHE LEU GLN HIS LYS ASP ASP ASN PRO ASN LED PRO ARG LEU VAL ARG PRO GLU					
485		500		515		530
	GTT CAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA VAL ASP VAL MET CYS THR ALA PHE HIS HIS ASN GLN GLU GLU THR PHE LEU LYS LYS TYR LEU					
545		560		575		590
	TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT CCT AAA TYR GLU ILE ALA ARG ARG HIS PRO TYR PHE TYR ALA PRO GLU LEU LEU PHE PHE ALA LYS					

FIGURE 4

	EP 0 200 590 B1
605	AGG TAT AAA GCT CCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCA GCG TGC CTG TTG ARG TYR LYS ALA PHE THR GLU CYS GLN ALA ALA ASP LYS ALA ALA CYS LEU LEU
620	
635	
650	
665	CCA AAG CTC CAT GAA CCT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT CCC AAA CAG AGA CTC AGG PRO LYS LEU ASP GLU LEU ARG ASP GLU GLY LYS ALA SER SER ALA LYS GLN ARG LEU LYS
680	
695	
710	
725	TGT CCC ACT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CCC CTC CYS ALA SER LEU GLN LYS PHE GLY GLU ARG ALA PHE LYS ALA TRP ALA VAL ALA ARG LEU
740	
755	
770	
785	AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAC TTA GTC ACA GAT CTT ACC SER GLN ARG PHE PRO LYS ALA GLU PHE ALA GLU VAL SER LYS LEU VAL THR ASP LEU THR

FIGURE 4

EP 0200590 B1

845 860 875 890
AAA GTC CAC ACC GAA TGC TCC CAT CGA GAT CTC CTT GAA TGT GCT GAT GAC ACC CCC GAC
LYS VAL HIS THR GLU CYS CYS HIS GLY ASP LEU LEU GLU CYS ALA ASP ASP ARG ALA ASN

905 920 935 950
CTT GCC AAC TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC TCC ACT AAA CTG AAG GAA TGC TGT
LEU ALA LYS TYR ILE CYS GLU ASN GLN ASN SER TLE SER SER LYS LEU LYS GLU CYS CYS

965 980 995 1010
GAA AAA CCT CTC TTG GAA AAA TCC CAC TCC ATT GCC GAA GTC GAA AAT GAT GAG ATG CCT
GLU LYS PRO LEU LEU GLU LYS SER HIS CYS ILE ALA GLU VAL GLU ASN ASN ASP GLU MET PRO

1025 1040 1055 1070
GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCG CCT GAT TTT GTC GAA AGT AGC GAT GTC TCC AAA AAC TAT
ALA ASP LEU PRO SER LEU ALA ALA ASP PHE VAL GLU SER LYS ASP VAL CYS LYS ASN TYR

FIGURE 4

EP 0 200 590 B1

1085 1100 1115 1130
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC TTG GCC ATG TTT TCG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT
ALA GLU ALA LYS ASP VAL PHE LEU GLY MET PHE LEU TYR GLU TYR ALA ARG ARG HIS PRO

1145 1160 1175 1190
GAT TAC TCT GTC GTC CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG
ASP TYR SER VAL VAL LEU LEU ARG LEU ALA LYS THR TYR GLU THR THR LEU GLU LYS

1205 1220 1235 1250
TGC TGT GCC GCT GCA CAT CCT CAT GAA TGG TAT GCA AAA GTC TTC GAT GAA TTT AAA CCT
CYS CYS ALA ALA ALA ASP PRO HIS GLU CYS TYR ALA LYS VAL PHE ASP GLU PHE LYS PRO

1265 1280 1295 1310
CTT ATG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA CAT TCT GAG CCT TTG GAG CAG GTT GGA
LEU MET GLU GLU PRO GLN ASN LEU ILE LYS GLN ASN CYS GLU LEU PHE GLU GLN LEU GLY

FIGURE 4

EP 0 200 590 B1

1325 1340 1355 1370
GAG TAC AAA TTC CAG AAC GAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAG CTA GAA CCC CAA GTC TCA
GLU TYR LYS PHE GLN ASN ALA LEU LEU VAL ARG TYR THR LYS LYS VAL PRO GLN VAL SER

1385 1400 1415 1430
ACT CCA ACT CCT CTT GCA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTC GGC ACC AAA TGT TGT AAA
THR PRO THR LEU VAL GLU VAL SER ARG ASN LEU GLY LYS VAL GLY SER LYS CYS CYS LYS LYS

1445 1460 1475 1490
CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTC GTC CTG AAC CAG
HIS PRO GLU ALA LYS ARG MET PHE PRO CYS ALA GLU ASP TYR LEU SER VAL VAL LEU ASN GLN

1505 1520 1535 1550
TTA TCT GTC TTG CAT GAG AAA ACC CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA
LEU CYS VAL LEU HIS GLU LYS THR PRO VAL SER ASP ARG VAL THR LYS CYS CYS THR GLU

FIGURE 4

EP 0 200 590 B1

1565 1580 1595 1610
TCC TTC GTC AAC AGG CGA CCA TGG TTT TCA CCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC
SER LEU VAL ASN ARG ARG PRO CYS PHE SER ALA LEU GLU VAL ASP GLU THR TYR VAL PRO

1625 1640 1655 1670
AAA GAG TTT AAT CCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAC
LYS GLU PHE ASN ALA GLU THR PHE THR PHE HIS ALA ASP ILE CYS THR LEU SER GLU LYS

1685 1700 1715 1730
GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CCT GTT GAG CTT GTC AAA CAC AAG CCC AAG GCA
GLU ARG GLN ILE LYS GLN THR ALA LEU VAL GLU LEU HIS LYS PRO LYS ALA

1745 1760 1775 1790
ACA AAA GAG CAA CTG AAA CCT GTT ATG GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC
THR LYS GLU GLN LEU LYS ALA VAL MET ASP PHE ALA ALA PHE VAL GLU LYS CYS CYS

FIGURE 4

1805	1820	1835	1850
AAG GCT GAC GAT AAC GAA ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT CTT GCT GCA ACT			
LYS ALA ASP ASP LYS GLU THR CYS PHE ALA GLU GLU GLY LYS LYS LEU VAL ALA ALA SER			
2			
		1865	1880
		<u><u>585-STOP</u></u>	
		CAA GCT GCC TTA CGC TAA TAA CAT CAC ATT	
		GLN ALA ALA LEU GLY LEU	